

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Medicina Dentária

# **Clorohexidina: influência na durabilidade da adesão resina-dentina**



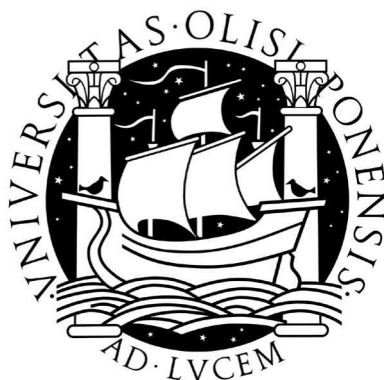
João Henrique Palma Agostinho da Silva Vinagre

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2012

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Medicina Dentária

# **Clorohexidina: influência na durabilidade da adesão resina-dentina**



Dissertação orientada pela Doutora Ana Pequeno

João Henrique Palma Agostinho da Silva Vinagre

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2012

# Agradecimentos

Gostaria de expressar o meu grande agradecimento:

À Doutora Ana Pequeno, por ter aceite o meu convite para orientar esta dissertação e por toda a motivação, apoio, aconselhamento e disponibilidade, não só na rigorosa correcção desta monografia como ao longo dos anos em que tive o privilégio de ser seu discente.

Aos caríssimos João Ribeiro Vinagre e Maria Alzira Vinagre, meu pai e mãe, pela inextinguível e incondicional dedicação em todos os momentos deste meu percurso académico, que ajudaram a tornar possível, bem como da minha vida.

Às estimadas Maria Inácia Palma e Alexandrina Ribeiro Vinagre, pela generosidade no acompanhamento da minha vida e percurso como só uma avó sabe ter.

A todos os meus amigos de faculdade cujo companheirismo, amizade e camaradagem providenciaram ao longo destes anos a motivação e o valor indispensáveis a um percurso sentido como completo e realizado.

À Ana Correia, por partilhar comigo as vivências de um percurso que nunca deixou de primar por fazer sempre, a cada momento, mais especial.

# Índice

	<b>Pág.</b>
Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	
1.1 Perspectiva sobre a adesão dentária em esmalte e em dentina	3
1.2 Perspectiva sobre a clorhexidina em dentisteria	7
2. Metaloproteinases de matriz e relação com a adesão dentinária	8
3. Influência da clorhexidina sobre as MMPs e adesão dentinária	11
4. Factores condicionantes do benefício da clorhexidina na adesão	
4.1 Protocolo de aplicação	16
4.2 Tipo de adesivo	21
5. Conclusões	23
6. Referências Bibliográficas	24

## Resumo

Este trabalho teve como objectivo fazer uma pesquisa bibliográfica acerca da influência da clorohexidina na adesão resina-dentina.

Foi feita uma pesquisa nas bases de dados PUBMED/MedLine, a qual abordou o período compreendido entre 1954 e 2012. Foram ainda consultados livros e revistas científicas relevantes para o tema, disponíveis na biblioteca da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa.

A análise da bibliografia consultada evidencia a capacidade da clorohexidina tornar mais durável a adesão de restaurações em resina à dentina (Moon *et al.* 2010), o maior desafio na adesão dentária até à presente data (Kugel & Ferrari, 2000).

A clorohexidina é, há várias décadas, uma substância utilizada em diversas áreas da medicina dentária enquanto antiséptico (Lindhe, 2003; Slot, 2011) e, recentemente, também aplicada como inibidor enzimático de metaloproteinases de matriz, no âmbito da adesão dentária (Pashley *et al.*, 2004).

As metaloproteinases de matriz presentes na dentina têm mostrado ser umas das responsáveis pela degradação da matriz de colagénio da camada híbrida da adesão e pela perda da sua estabilidade ao longo do tempo (Pashley *et al.*, 2004).

Tem surgido uma crescente evidência científica do benefício da clorohexidina, a qual apresenta capacidade de inibir as referidas metaloproteinases (Gendron *et al.*, 1999), para a manutenção da integridade da camada híbrida (Moon *et al.*, 2010).

Actualmente, pode assim ser sugerido um protocolo de adesão que contemple a aplicação de clorohexidina a 2%, durante 30-60 segundos após o condicionamento ácido da dentina, em sistemas adesivos *total etch*, para promover uma adesão mais estável e durável (Hebling *et al.*, 2005; Brackett *et al.*, 2007; Carrilho *et al.*, 2007b; Brackett *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2010).

Protocolos mais simplificados encontram-se presentemente em estudo e, apesar de uma melhor compreensão dos mecanismos por detrás deste efeito benéfico da clorohexidina ser necessária, os resultados apresentam-se como promissoramente positivos e são, no seu todo, de particular relevância para o clínico no sentido de obter um maior sucesso e durabilidade das suas restaurações (Moon *et al.*, 2010).

**Palavras-chave:** Clorohexidina, adesão dentinária, camada híbrida, metaloproteinases de matriz.

# Abstract

The goal of this essay was to perform a literature review on the influence of chlorhexidine on the durability of resin-dentin bonding.

The data was retrieved from the database PUBMED/MedLine (papers from 1954 to 2012), and also included relevant books and scientific journals available in the library of the Faculty of Dentistry of the University of Lisbon.

The literature review reveals the capability of chlorhexidine to make more durable the bonding of restorations to dentine (Moon *et al.* 2010), the greatest challenge in dental adhesion to the present date (Kugel & Ferrari, 2000).

Chlorhexidine has been widely used for decades in several areas of dentistry as an antiseptic agent (Lindhe, 2003; Slot, 2011) and, recently, also as an enzymatic inhibitor of matrix metalloproteinases in dental adhesion (Pashley *et al.*, 2004).

Dentin-bound matrix metalloproteinases have been demonstrated to be responsible for the degradation of the collagen matrix of the hybrid layer and consequently of its loss of stability over time (Pashley *et al.*, 2004).

Chlorhexidine, having shown the capability to inhibit the said enzymes (Gendron *et al.*, 1999), has then been studied as an addition to the existing bonding protocols in order to make bonding more durable, existing now a crescent scientific ground of its benefit in terms of maintaining hybrid layer integrity (Moon *et al.*, 2010).

Presently, it can therefore be recommended a bonding protocol that contemplates the use of a 2% chlorhexidine solution, for 30-60 seconds after acid etching of dentin in total etch adhesives, in order to promote a more stable and durable hybrid layer (Hebling *et al.*, 2005; Brackett *et al.*, 2007; Carrilho *et al.*, 2007b; Brackett *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2010).

New and more simplified bonding protocols are currently being studied and developed, and while further research and better comprehension of the mechanisms behind this beneficial effect of chlorhexidine are needed, current data are proving to be promisingly positive, and are of particular clinical relevance in terms of achieving a greater success and durability of dental restorations (Moon *et al.*, 2010).

**Keywords:** Chlorhexidine, dentin bonding, hybrid layer, matrix metalloproteinases.

# 1. Introdução

## 1.1 Perspectiva sobre a adesão dentária em esmalte e em dentina

A adesão é o processo pelo qual se forma uma ligação adesiva, que consiste em dois substratos intimamente unidos. Os adesivos dentários são soluções de monómeros de resina que unem um material restaurador a um substrato dentário – esmalte, dentina ou cimento – após polimerização (Perdigão, 2007).

O princípio da adesão dentária ocorreu em 1955, quando Buonocore reportou o uso de ácido fosfórico a 85% como forma de “tornar a superfície dentária mais receptiva à adesão” (Buonocore, 1955). O trabalho pioneiro de Buonocore revolucionou a Dentisteria Restauradora e abriu caminho à gradual substituição dos tradicionais princípios de retenção mecânica de restaurações e extensão preventiva por técnicas adesivas aliadas a novos materiais e a cavidades mais conservadoras da estrutura dentária (Summitt *et al.*, 2001).

Desde os primeiros trabalhos de Buonocore, a adesão dentária tem passado por uma grande evolução, mas se ao esmalte a adesão acabou por se revelar mais fiável e consistente, já a adesão à dentina tem mostrado ser mais delicada e imprevisível, situação que levaria à busca que tem durado até aos dias de hoje pela melhor forma de conseguir ultrapassar esta dificuldade na adesão (Kugel & Ferrari, 2000, Coelho *et al.*, 2012).

Esta dualidade deve-se essencialmente às diferenças estruturais e de composição entre esmalte e dentina. O esmalte é composto por cerca de 96% de matéria inorgânica (cálcio e fosfato - hidroxiapatite) e 4% de matéria orgânica, já a dentina é composta de cerca de 45% de matéria inorgânica, 33% de matéria orgânica – 17% de colagénio em volume, sobretudo colagénio tipo I – e 22 % de água (Kugel & Ferrari, 2000; Perdigão, 2007; Borges *et al.*, 2010). O princípio fundamental da adesão dentária passa pela substituição de material inorgânico do dente por resina sintética. Esta substituição compreende duas fases: a primeira onde se dá a remoção de cristais de fosfato de cálcio e a criação de microporosidades, tanto no esmalte como na dentina (através do

condicionamento ácido), e a segunda, a chamada hibridização, que envolve a infiltração e subsequente polimerização da resina nessas microporosidades criando, em primeira instância, uma retenção micromecânica (van Meerbeek *et al.*, 2003; de Munck *et al.*, 2005).

A natureza mais orgânica e húmida da dentina torna assim a adesão a este substrato particularmente difícil (Perdigão, 2007). Ao contrário da estrutura do esmalte, com cristais prismáticos de hidroxiapatite formando uma estrutura particularmente organizada e compacta, a dentina apresenta-se, desse ponto de vista, menos homogênea e definida. O seu componente inorgânico está enquadrado na matriz orgânica de colagénio, acrescentando-se uma íntima relação da dentina com o tecido pulpar, com numerosos canais ou túbulos, que são veículos de fluido com um pequeno, mas constante, fluxo centrífugo a partir da polpa (além de alojarem os próprios prolongamentos odontoblásticos), percorrendo toda a espessura da dentina desde a junção amelodentinária até à polpa (Swift *et al.*, 1995).

A estrutura dentinária apresenta ainda uma diferenciação entre dentina peritubular, composta essencialmente por cristais de apatite e pouca matéria orgânica, e a dentina intertubular, composta essencialmente de uma matriz de colagénio tipo I reforçada por apatite, variando a distribuição destas em profundidade – a dentina peritubular ocupa cerca de 60% da área dentinária perto da polpa, até cerca de 3% dessa área perto da junção amelodentinária, enquanto a dentina intertubular varia entre cerca de 12% na pré-dentina até cerca de 96% junto da junção amelodentinária (Swift *et al.*, 1995; Marshall *et al.*, 1997). Os túbulos dentinários representam ainda, à partida, as únicas porosidades disponíveis para a criação de microretenção (Kugel & Ferrari, 2000). Outros factores como o tipo de dentina, a idade do dente, a orientação dos túbulos ou a presença de cimento podem influenciar a adesão à dentina. (Swift *et al.*, 1995; Eick *et al.*, 1997; Kugel & Ferrari, 2000).

A adesão à dentina tornou-se à partida ainda mais complexa devido à existência da *smear layer* (Kugel & Ferrari, 2000). Esta camada é formada em resultado da instrumentação dentária e consiste numa mistura de resíduos da estrutura dentária, nomeadamente colagénio desnaturado, resíduos minerais de hidroxiapatite e bactérias, cobre uniformemente os componentes estruturais normais da dentina e penetra vários



micrómetros nos túbulos dentinários – formando, assim, os chamados *smear plugs* (Marshall *et al.*, 1997, Eick *et al.*, 1997, Perdigão, 2007).

Uma vez que a *smear layer* constitui uma verdadeira barreira física à adesão à dentina, a estratégia dos sistemas adesivos passa por dissolvê-la ou torná-la permeável para que os monómeros dos adesivos possam contactar directamente com a estrutura dentinária (Perdigão, 2007).

Assim, apesar das diferentes abordagens de classificação da grande diversidade de adesivos que têm surgido desde a sua introdução, é essencialmente considerada para efeitos de definição da estratégia de adesão a forma como os adesivos interagem com esta *smear layer* (van Meerbeek *et al.*, 2001; Summitt *et al.*, 2001; van Meerbeek *et al.*, 2003; Perdigão, 2007).

Ainda que podendo classificar os adesivos segundo a sua geração (de 1ª a 7ª), uma classificação em largo uso apesar da sua dependência do mercado, das primeiras gerações se terem tornado obsoletas e de por vezes a geração seguinte não significar necessariamente uma melhoria a nível clínico sobre as anteriores (Coelho *et al.*, 2012), importa sobretudo classificar a estratégia de adesão usada, existindo essencialmente dois tipos de adesivos nesse particular:

- Sistemas *total etch* ou *etch-and-rinse* (E&R) – removem totalmente a *smear layer*, servindo-se para isso de um passo separado para o condicionamento, geralmente com aplicação de ácido fosfórico a 35-40% e lavagem subsequente (de Munck *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2012).
- Sistemas *self-etch* ou *etch-and-dry* (E&D) – uma abordagem alternativa baseada na utilização de um condicionamento ácido não lavável que simultaneamente incorpora a resina adesiva ou apenas o *primer* (monómero bi-funcional) na dentina (de Munck *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2012).

Com a estratégia de *etch-and-rinse*, o esmalte e a dentina são então tratados com um gel ácido (normalmente ácido fosfórico entre 35% e 40%) de forma a remover a *smear layer* e a desmineralizar os cristais de hidroxiapatite à superfície, expondo uma rede de colagénio microporosa virtualmente desprovida de hidroxiapatite. De seguida,

aplica-se uma mistura de monómeros de resina – *primer* e adesivo – dissolvidos num solvente orgânico, com o objectivo de infiltrar a dentina condicionada (van Meerbeek *et al.*, 2003; Perdigão, 2007). Convencionalmente, este sistema conta com três passos distintos: aplicação do condicionante ácido, aplicação do *primer* e finalmente a aplicação da resina adesiva, seguida de polimerização. Sistemas simplificados, com dois passos – com possíveis contrapartidas daí provenientes – combinam a aplicação de *primer*/adesivo numa só fase mas contemplam sempre uma fase de condicionamento ácido em separado, seguido de lavagem (van Meerbeek *et al.*, 2003; de Munck *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2010). Os monómeros de resina infiltram-se nos espaços preenchidos com água, entre fibras adjacentes de colagénio, que estavam antes ocupadas por cristais de hidroxiapatite, entretanto desmineralizados, e desta infiltração resulta uma zona de interdifusão resina-dentina – a camada híbrida – composta por colagénio, resina, hidroxiapatite e vestígios de água (Nakabayashi *et al.*, 1982; Perdigão, 2007).

A estratégia *self-etch*, mais recente, caracteriza-se pela desmineralização e infiltração concomitante dos monómeros de resina, havendo portanto uma incorporação da *smear layer* na camada híbrida. Os primeiros adesivos deste género contemplavam dois passos, um *primer* ácido e uma resina adesiva, mas mais recentemente têm ganho destaque os denominados adesivos *all-in-one*, que incorporam numa única solução o condicionante, o *primer* e a resina adesiva (van Meerbeek *et al.*, 2003; Perdigão, 2007; Borges *et al.*, 2010). Esta estratégia apresenta-se apelativa pela simplificação do protocolo e diminuição do tempo e sensibilidade da técnica, bem como pela possibilidade de outras vantagens como uma eventual ligação química entre as resinas e os cristais inorgânicos incorporados. No entanto, presentemente, pouco se sabe acerca da durabilidade a longo termo destes sistemas, temendo-se que, entre outros fenómenos, o comportamento da camada híbrida como membrana semipermeável favoreça a hidrolização da estrutura da mesma (van Meerbeek *et al.*, 2003; de Munck *et al.*, 2005; Perdigão, 2007; Borges *et al.*, 2010). Actualmente os resultados, nomeadamente *in vitro*, têm sido díspares e nem sempre correspondentes ao esperado, encontrando-se estes sistemas em constante evolução de forma a potenciar as suas vantagens, enquanto se anulam as contrapartidas que foram sendo verificadas (Perdigão, 2007; Borges *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2012).

Independentemente do tipo de adesivo, ainda que a retenção das restaurações por um período prolongado de tempo não represente já um problema clínico e que os actuais adesivos tentem contrariar as contrapartidas da contracção de polimerização, a durabilidade da ligação entre os adesivos e a matriz dentinária, e a manutenção de uma restauração adesiva selada contra a infiltração marginal, ainda são dos principais factores que limitam a sua longevidade clínica (van Meerbeek *et al.*, 2003; de Munck *et al.*, 2005; Hebling *et al.*, 2005).

## **1.2 Perspectiva sobre a cloroheixidina em medicina dentária**

A cloroheixidina – CHX – (1,6-di(4-clorofenilbiguanida)hexano; fórmula  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ ) foi introduzida como antiséptico tópico há várias décadas. Inicialmente Davies *et al.*, em 1954, confirmou a sua eficácia antibacteriana, e foi difundida por todo o mundo a partir dessa altura (Foulkes, 1973). Trata-se de uma molécula simétrica, anfipática, com dois grupos funcionais guanidina ionizáveis e constitui uma forte base. Apresenta uma grande capacidade quelante (em relação com a propriedade catiónica) em ambientes de pH superior a 3,5 (Lindhe *et al.*, 2003; de Munck *et al.*, 2009; Carrilho *et al.*, 2010).

A CHX é mais estável sobre a forma de sal, sendo originalmente empregue na forma de cloridrato e acetato. Contudo, a má solubilidade em água destas apresentações levou, desde cerca de 1957, ao maior uso da sua apresentação actual: o digluconato de cloroheixidina (Foulkes, 1973).

As características da cloroheixidina tornam-na num antiséptico de referência, com óptimas propriedades antibacterianas de largo espectro (tanto para bactérias gram-positivas como para gram-negativas) e antifúngicas, sendo bactericida em concentrações mais elevadas e bacteriostático em menores concentrações (Davies *et al.*, 1954; Lindhe *et al.*, 2003; McBain *et al.*, 2003; Puig Silla *et al.*, 2008; Carrilho *et al.*, 2010).

Sendo uma forte base catiónica de grande capacidade quelante, a cloroheixidina actua ligando-se à parede celular dos microrganismos, carregada negativamente, e provoca nestes a perda do controlo osmótico ao interferir com a integridade da

membrana, resultando assim na sua morte celular (Marsh, 1992; Estrela *et al.*, 2003; Attin *et al.*, 2008; Milstone *et al.*, 2008; De Souza *et al.*, 2011). Neste contexto de interferência no metabolismo dos microrganismos, refira-se ainda a capacidade de inibição da proteólise bacteriana (Marsh, 1992).

Com efeito, a CHX tem sido amplamente usada na medicina dentária pelo seu largo espectro antibacteriano e substantividade, nomeadamente como antiséptico pré-cirúrgico e como agente de controlo de placa no tratamento periodontal. Também é utilizada na área de endodontia como irrigante antiséptico e na dentisteria para controlo da doença de cárie ou como desinfectante de preparações cavitárias. Estas duas últimas indicações nem sempre têm sido consensuais (Perdigão *et al.*, 1994; Estrela *et al.*, 2003; Lindhe *et al.*, 2003; Say *et al.*, 2004; Siqueira *et al.*, 2007; Bengtson *et al.*, 2008; Llena-Puy & Forner-Navarro, 2008; Puig-Silla *et al.*, 2008; Slot *et al.*, 2011).

A partir do seu uso inicial como desinfectante cavitário, surgiu uma questão: poderia a clorohexidina prejudicar a força e qualidade da adesão (Perdigão, 2010)? Actualmente, encontra-se em estudo o efeito benéfico a longo prazo da aplicação da clorohexidina no processo da adesão dentária, aproveitando as suas características de capacidade de quelação e substantividade, funcionando como inibidor de proteases ao nível da camada híbrida – nomeadamente das metaloproteinases de matriz – que, de outra forma, degradariam as fibras de colagénio com o tempo (Carrilho *et al.*, 2010; Perdigão, 2010)

## **2. Metaloproteinases de matriz e relação com a adesão dentinária**

As metaloproteinases de matriz – MMP – são uma classe de endopeptidases capazes de hidrolizar componentes da matriz extracelular (Chaussain-Miller *et al.*, 2006; Varun *et al.*, 2012). Presentemente, 23 genes para MMP estão identificados em humanos e um número ainda maior de tipos distintos de MMP foram diferenciados (Visse & Nagase, 2003). A maioria são proteínas de múltiplos domínios que podem ser definidas por um largo número de parâmetros, incluindo a capacidade de clivar componentes da matriz extracelular, a sua dependência de zinco e cálcio, a conservação

de sequências de aminoácidos específicas entre famílias e a inibição da sua actividade enzimática por inibidores tecidulares de metaloproteinases (TIMPs) endógenos (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Nagase & Woessner, 1999; Visse *et al.*, 2003; Chaussain-Miller *et al.*, 2006; Tezvergil-Mutluay *et al.*, 2010).

Classificam-se as MMPs essencialmente em seis grupos, baseados na sua homologia estrutural e especificade para o substrato (Visse & Nagase, 2003):

- Colagenases – MMP-1, MMP-8, MMP-13;
- Gelatinases – MMP-2, MMP-9;
- Estromelisinases – MMP-3, MMP-10, MMP-11;
- MMPs transmembranares (MT-MMPs) – MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25;
- Matrilisinas – MMP-7 e MMP-26;
- “Outras” - MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27, and MMP-28.

As MMPs desempenham um papel central em muitos processos biológicos, entre os quais o desenvolvimento e a remodelação normais dos tecidos (Visse *et al.*, 2003; Chaussain-Miller *et al.*, 2006), e durante o desenvolvimento do dente acabam por ficar aprisionadas na matriz da dentina (Mazzoni *et al.*, 2006). Várias MMPs encontram-se assim presentes na dentina, possivelmente regulando a organização e mineralização referente às fibrilhas de colagénio da matriz dentinária. Elas são encontradas em maior número na região mais próxima da junção amelodentinária (bem como na pré-dentina), tendo também, por isso, a sua presença e acção vindo a ser associada à progressão das lesões de cárie, sobretudo ao nível dessa região (Zhang *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2010; Boushell *et al.*, 2011). Em lesões de cárie, a acção das MMPs na dentina pode acontecer mesmo sem a presença de MMPs provenientes da

saliva ou de bactérias (Pashley *et al.*, 2004; Chaussain-Miller *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009).

Uma variedade de MMPs foi já encontrada em lesões de cárie, incluindo a MMP-2 (gelatinase), MMP-8 (colagenase), MMP-9 (gelatinase) e MMP-20 (enamelinase). A relação das MMPs endógenas com a degradação das estruturas dentinárias decorrentes da progressão das lesões de cárie abriu caminho às recentes pesquisas respeitantes aos efeitos das MMPs na estabilidade da camada híbrida da adesão dentinária (Chaussain-Miller *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2010).

Com efeito, nem toda a dentina desmineralizada é efectivamente coberta por adesivo (estando por vezes combinado a esse facto o uso de sistemas adesivos com mais componentes hidrofílicos e/ou acídicos), havendo assim regiões na camada híbrida que permanecem com água (factor também dependente do solvente no adesivo) e/ou espaços onde a actividade proteolítica pode ocorrer (Hashimoto *et al.*, 2005). Juntando a esse facto a ainda mais relevante reactivação das MMPs presentes na dentina, através da exposição a níveis de pH mais baixos (particularmente abaixo de pH 4.5), como sucede durante o procedimento de adesão dentária (nomeadamente após o condicionamento ácido), podemos comprometer a durabilidade da adesão através da exposição das fibrilhas de colagénio da camada híbrida à actividade destas enzimas, após condicionamento ácido (Hashimoto *et al.*, 2000; Pashley *et al.*, 2004; Mazzoni *et al.*, 2006; Nishitani *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2010).

O condicionamento ácido dos adesivos E&R, tendo como consequência um nível de pH comparativamente mais baixo, parece ser capaz de reactivar algumas MMP's subjacentes mas, também, desnaturar parte delas. Nos adesivos *self-etch* o sistema parece ser ácido o suficiente para também as reactivar, mas não para as desnaturar da mesma forma que os sistemas *etch-and-rinse*. Os estudos sugerem que a actividade proteolítica existente esteja relacionada com MMPs não desnaturadas e provenientes da camada subjacente de dentina. Assim, os adesivos E&D apresentam actividades proteolíticas superiores (Pashley *et al.*, 2004; Mazzoni *et al.*, 2006; Nishitani *et al.*, 2006; Zhang *et al.* 2009; Moon *et al.*, 2010).

O envolvimento das MMPs endógenas neste processo de degradação acaba por ser indirectamente confirmado pelo facto da aplicação de clorhexidina, inibidora das

MMP-2, MMP-8 e MMP-9 (Gendron *et al.*, 1999), efectuada em dentina condicionada por ácido, ter vindo a resultar na preservação do colagénio na camada híbrida (Hebling *et al.*, 2005; Mazzoni *et al.*, 2006). De um ponto de vista clínico, a inibição da degradação das fibrilhas de colagénio incompletamente infiltradas por resina – por exemplo através da aplicação de cloroheixidina durante a adesão – pode ser vantajosa (Pashley *et al.*, 2004).

### **3. Influência da cloroheixidina sobre as MMPs e adesão dentinária**

A inibição das MMPs mais significativas para a degradação das fibrilhas de colagénio no meio oral foi reportada primeiramente por Gendron *et al.* em 1999, na altura com vista à demonstração de um efeito benéfico adicional (além do efeito antiséptico) do uso da cloroheixidina no tratamento de patologias periodontais. Neste trabalho, concluiu-se haver uma capacidade inibitória significativa da cloroheixidina, verificável para as MMP-2, MMP-8 e MMP-9 em concentrações a partir de 0.0001%, 0.01%-0.02% e 0.002%, respectivamente, sendo que a concentração mínima necessária para a inibição destas MMPs em conjunto, deveria assim rondar os 0.01%-0.02%, pese embora a maior sensibilidade das MMP-2 e MMP-9. Estima-se que este processo inibitório se deva à interferência, pela forte capacidade quelante da CHX, na disponibilidade de iões cálcio e zinco necessários à actividade das MMPs (Gendron *et al.* em 1999, Moon *et al.*, 2010)

No contexto da adesão dentária, o efeito de agentes desinfectantes aplicados nas cavidades no decorrer do protocolo adesivo, com vista à eliminação de bactérias residuais, já havia sido objecto de estudo antes da descoberta desta nova propriedade da cloroheixidina. Apesar de, em certos trabalhos, ter sido encontrada alguma diminuição da qualidade imediata da adesão nos grupos onde fora aplicada cloroheixidina *versus* grupos de controlo, a aplicação de cloroheixidina após o condicionamento ácido da dentina (o qual promove o aumento de superfície da mesma, a remoção de *smear layer* residual e facilita concomitantemente a infiltração pelos *primers* de resina) não constitui um efeito adverso na imediata formação da interface de união da resina à dentina

(Perdigão *et al.*, 1994; Meiers & Shook, 1996; Gürgan *et al.*, 1999; Say *et al.*, 2004; Bengston *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2008), sendo inclusivamente sugerida como agente de remolhamento da dentina antes da aplicação de *primers* hidrofílicos (Pilo *et al.*, 2001; Say *et al.*, 2004).

O facto de certos estudos iniciais reportarem por vezes uma certa perda da qualidade imediata da adesão à dentina, mediante aplicação de clorhexidina, pode ser explicado pelas limitações dos ensaios regularmente utilizados na época para avaliar a adesão (Van Noort *et al.*, 1991; Van Noort, 1994; Scherrer *et al.*, 2010) e pelas discrepâncias entre tipos de adesivos usados nesses ensaios (Say *et al.*, 2004; Bengston *et al.*, 2008). Mas, de qualquer das formas, o uso de clorhexidina com vista aos objectivos primeiramente referidos acabou por ser considerado desnecessário, uma vez que o ácido fosfórico, no contexto dos próprios adesivos dentários, apresentava por si só a capacidade anti bacteriana suficiente para os atingir (Vaidyanathan *et al.*, 2009). Um outro ponto a ter em atenção no que concerne a utilização de CHX, prende-se com a sua capacidade de poder acarretar alguma alteração na coloração das estruturas (Lindhe *et al.*, 2003; Perdigão, 2010), em resultado da sua forte actividade quelante e interacção com iões metálicos e pigmentos. Um estudo de Omata *et al.* (2006) refere que a CHX pode potenciar uma maior pigmentação associada a chá ou café, se aplicada em cavidades posteriormente restauradas com resina. Este factor é sobejamente conhecido quando associado ao uso, sobretudo prolongado, de CHX (Lindhe *et al.*, 2003) – no entanto, nenhum dos estudos destinados a avaliar a adesão dentária relacionada com a CHX acrescentou qualquer suporte à eventual preocupação com esse fenómeno neste contexto.

No respeitante ao tipo de ensaios destinados à avaliação da qualidade e durabilidade da adesão, importa referir que a constante evolução dos sistemas adesivos e a variabilidade dos resultados associada aos ensaios mais acessíveis e rotineiros como o de resistência ao cisalhamento (*shear bond strength*), tracção (*tensile bond strength*) e microtracção (*microtensile bond strength*), têm feito com que fosse procurada uma maior padronização e fiabilidade na forma de testar a durabilidade da adesão. Contudo, desde a introdução do ensaio de microtracção ( $\mu$ TBS) que este tem sido, em combinação também com a microscopia óptica ou electrónica, o mais regularmente usado – devido à sua capacidade de permitir a medição da resistência à tracção em superfícies muito



pequenas, à maior sensibilidade a diferentes regiões das amostras e a permitir novas geometrias das mesmas ou várias amostras do mesmo dente (Scherrer *et al.*, 2010).

Com a constatação da evidência morfológica da degradação das fibrilhas de colagénio da interface da adesão resina-dentina com o progredir do tempo (Hashimoto *et al.*, 2000) e com o antecedente da capacidade inibitória das enzimas proteolíticas da matriz dentinária pela clorohexidina, estabelecido por Gendron *et al.* em 1999, foi publicado por Pashley *et al.* (2004) o que seria um dos primeiros ensaios laboratoriais destinados a estudar o potencial efeito benéfico de um agente inibitório das MMPs (como a clorohexidina) no respeitante à durabilidade da adesão dentinária. Este autor concluiu primeiramente que as MMPs na dentina sã e na ausência de bactérias têm, efectivamente, a capacidade de, por si só, e com a progressão do tempo (no caso até 250 dias), degradar as fibrilhas de colagénio expostas pelo ataque ácido, e em segundo lugar que a clorohexidina possui a capacidade de contrariar (ou pelo menos retardar) esse processo.

Das conclusões apresentadas ao interesse da comprovação da clorohexidina como agente de redução da degradação da componente de colagénio da camada híbrida, ressalta o facto de, uma vez que já existia previamente a corrente da aplicação da clorohexidina como desinfectante de preparações cavitárias, se abrir a possibilidade do surgimento, num curto intervalo de tempo, de estudos *in vivo* concomitantemente a estudos *in vitro* a respeito deste tema (Pomacóndor-Hernández, 2010).

Em todos os estudos considerados nesta dissertação (com destaque para os estudos *in vivo*), desde o protocolo apresentado por Hebling *et al.* (2005) considerando a aplicação de uma solução de digluconato de clorohexidina a 2% durante 60 segundos após condicionamento ácido, e passando por todos os ensaios subsequentes, onde houve diferentes momentos de aplicação da clorohexidina e diferentes tipos de adesivo, verificou-se uma resistência imediata da adesão entre grupos de teste com aplicação de clorohexidina comparável àquela dos grupos de controlo em que esta não foi aplicada (Brackett *et al.*, 2007; Carrilho *et al.*, 2007a, Carrilho *et al.*, 2007b; Soares *et al.*, 2008; Brackett *et al.*, 2009; Breschi *et al.*, 2009; de Munck *et al.*, 2009; Loguercio *et al.*, 2009; Komori *et al.*, 2009; Stanislawczuk *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009).

Já entrando em equação com a variável do tempo, a diminuição da resistência adesiva e o aumento da microinfiltração foram menores ou mesmo inexistentes nos grupos de teste envolvendo aplicação de clorhexidina. Nenhum estudo de avaliação do benefício da incorporação de clorhexidina no protocolo adesivo de sistemas *total etch* reportou qualquer efeito adverso na qualidade ou resistência da adesão resina-dentina, quer no imediato, quer ao longo do tempo. (Carrilho *et al.*, 2007a; Carrilho *et al.*, 2007b; Breschi *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2009a; Loguercio *et al.*, 2009; Stanislawczuk *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009).

<b>Protocolo de aplicação de adesivos E&amp;R utilizando clorhexidina</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Condicionamento ácido da dentina com ácido fosfórico 37% por 15 segundos e esmalte por 30 segundos</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavar abundantemente com seringa de água e secar com spray de ar</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retirar o excesso de humidade com papel absorvente ou bola de algodão estéreis</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aplicar uma solução de digluconato de clorhexidina a 2% por 30-60 segundos</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retirar o excesso de humidade com papel absorvente ou bola de algodão estéreis</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aplicar o adesivo conforme as instruções do fabricante e fotopolimerizar</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceder à restauração com resina composta</li> </ul>

**Quadro 1.** – Discriminação, passo a passo, do protocolo de aplicação de CHX com vista à preservação da camada híbrida (Pomacóndor-Hernández, 2010), baseada no procedimento sugerido por Hebling *et al.*, 2005 e alguns estudos *in vivo* subsequentes com adesivos *total-etch*.

Comprovado assim indirectamente o papel das MMPs na degradação da camada híbrida ao longo do tempo, bem como o efeito benéfico da introdução de clorhexidina no protocolo de adesão (com o intuito de preservar a referida camada híbrida), avaliados por um período de pelo menos 14 meses *in vivo* (Carrilho *et al.*, 2007b) e 2 anos *in vitro*

(Breschi *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2010; Stanislawczuk *et al.*, 2011), surgiram então mais estudos com o intuito de avaliar outros parâmetros. As modificações estudadas ao protocolo inicial de Hebling *et al.* (2005) – quadro 1. – procuraram sobretudo evitar a adição de mais um passo clínico ao protocolo e promover e manter a simplificação de todo o processo – sendo disso exemplo a redução do tempo de aplicação da CHX (Stanislawczuk *et al.*, 2009; Breschi *et al.*, 2009; Loguercio *et al.*, 2009) e/ou a sua incorporação num dos componentes preexistentes do sistema adesivo (de Munck *et al.*, 2009; Stanislawczuk *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Stanislawczuk *et al.*, 2011). Da necessidade de salvaguardar a possibilidade da CHX poder exercer um efeito citotóxico (em particular em células da linha odontoblástica) caso esta conseguisse progredir pelos túbulos dentinários em concentrações acima de 0.01%-0.02% (Souza *et al.*, 2007; Loguercio *et al.*, 2009; Lessa *et al.*, 2010), procurou-se também investigar a mínima concentração de CHX necessária para que se verifique um efeito inibitório óptimo das MMPs (Loguercio *et al.*, 2009).

Como já referido, a maioria dos estudos acerca da durabilidade da adesão (no caso em relação com a clorohexidina) serviu-se, como ferramentas de avaliação dos parâmetros determinados, de microscopia (óptica ou electrónica e normalmente em relação com a infiltração com nitrato de prata – *silver nitrate uptake*, SNU) e de avaliação da resistência à microtração (*microtensile bond strength*,  $\mu$ TBS). Um dos aspectos deste último – o registo da região de fractura – merece uma menção à sua importância, uma vez que alguns dos estudos que o registaram (Carrilho *et al.*, 2007a; de Munck *et al.*, 2009; Loguercio *et al.*, 2009) acrescentam desta forma um dado que, após análise, pode ser mais um ponto a contribuir para a comprovação da degradação intrínseca da camada híbrida pelas MMP, caso as falhas sejam essencialmente coesivas (ou seja, exclusivamente em dentina ou compósito – possível sinal de despiste de amostras fora dos padrões) ou adesivas, com atenção aos grupos de teste e sobretudo de controlo: torna-se este um ponto corroborante da eficácia da CHX caso este tipo de falha adesiva seja diminuído no grupo de teste por comparação ao grupo de controlo.

Ainda que os resultados sugiram um efeito benéfico da aplicação de CHX, integrada no protocolo de adesão, para a estabilidade e durabilidade da adesão resina-dentina, tem permanecido a necessidade de uma mais cuidada avaliação do benefício deste procedimento. Será relevante considerar vários tipos de dentina utilizada

como substrato – seja de dentes decíduos, seja de dentina afectada por cárie (onde por exemplo a maior presença das MMPs pode representar um desafio adicional a agentes inibitórios das mesmas), por comparação com dentes permanentes e dentina sã, respectivamente, dadas as particularidades morfohistológicas das primeiras, aliadas à ainda curta evidência científica deste benefício (Hebling *et al.*, 2005; Komori *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2010; Leitune *et al.*, 2011). Importa também desenvolver uma mais aprofundada avaliação da concentração e tempo de aplicação ideais, no contexto do desenvolvimento de protocolos simples e seguros (tanto genéricos como específicos) para os vários tipos de adesivos disponíveis, sendo previsível que, futuramente, continuem a aparecer mais estudos por forma a testar e comprovar novos adesivos e procedimentos, em particular em relação ao benefício da CHX com adesivos *self-etch*, posto que é esta ainda uma categoria de adesivos que regista um menor número de trabalhos que confirmam suporte científico a esta associação (Moon *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Alex, 2012).

## **4. Factores condicionantes do benefício da clorhexidina na adesão**

### **4.1 Protocolo de aplicação**

Desde a primeira proposta de Hebling *et al.* (2005) para um protocolo de integração da CHX *in vivo* em sistemas *etch-and-rinse*, uma série de variações ao mesmo tem, como já referido, sido testada em vários estudos publicados num relativamente curto espaço de tempo. O protocolo considerando uma aplicação de CHX a 2% durante 60 segundos após condicionamento ácido tem revelado promover um benefício significativo na durabilidade da camada híbrida da adesão, face a controlos sem CHX, atestado *in vivo* para um período de pelo menos 14 meses (Carrilho, 2007b). Até agora, este método é ainda o único com comprovação de cariz clínico, além de ser simples de adoptar, e será provavelmente o primeiro a conseguir maior aceitação inicial (Moon *et al.*, 2010). Contudo, a adição de um novo passo e o consumo de mais tempo para a execução deste procedimento contrastam com a necessidade clínica de simplificação de todo o processo (Tay & Pashley, 2003).

Importa referir que a CHX, em concentrações a partir de 0.01%-0.02%, apresenta potencial citotóxico para células odontoblásticas, as quais são responsáveis pela reparação/regeneração pulpar e pela formação de barreiras tecidulares mineralizadas, e são também susceptíveis a que uma lesão química prejudique a sua capacidade reparadora do complexo pulpodentinário (Souza *et al.*, 2007; Lessa *et al.*, 2010). A aplicação da CHX em cavidades conta, à partida, com estrutura dentinária suficiente para actuar como barreira de protecção contra efeitos citotóxicos de contacto químico directo, no entanto permanece até à data a inexistência de suficiente suporte científico que exclua a capacidade das moléculas de CHX se difundirem através dos túbulos dentinários em condições de serem prejudiciais às células pulpares (Loguercio *et al.*, 2009). Contudo, a presença de CHX em concentrações consideravelmente baixas parece ser suficiente para inibir a actividade proteolítica das MMPs, incluindo as provenientes da matriz dentinária (Gendron *et al.*, 1999; Carrilho *et al.*, 2009). Segundo Gendron *et al.* (1999), MMPs endógenas específicas responsáveis pela degradação de matrizes de colagénio – MMP-2, MMP-8, MMP-9 – podem ser inibidas por CHX em concentrações tão baixas quanto 0.0001%, 0.01%-0.02% e 0.002% respectivamente, sendo que não foi verificado efeito citotóxico assinalável para células odontoblásticas da CHX nestas concentrações (Souza *et al.*, 2007).

Considerando estas questões, a situação ideal contemplaria um protocolo que incluísse não só a utilização de CHX na menor concentração possível que pudesse permitir o completo benefício das suas capacidades inibitórias das MMPs, mas que incluísse também o tempo de aplicação mais curto possível por forma a cumprir a estratégia de manter tão simples quanto possível os protocolos de adesão (Loguercio *et al.*, 2009).

Para alcançar este propósito, muito contribui a grande substantividade da CHX – ou seja, a capacidade de permanecer adsorvida às estruturas por um período alargado de tempo – bem como a sua capacidade de apresentar uma libertação constante e gradual para o meio oral, sendo que se prevê que a inibição das MMPs em dentina tratada com CHX se mantenha conquanto esta permaneça ligada à matriz dentinária, sugerindo assim um efeito benéfico prolongado da CHX na integridade da camada híbrida (Stanislawczuk *et al.*, 2009; Carrilho *et al.*, 2010).

Nesse sentido, tanto Breschi *et al.* (2009) como Campos *et al.* (2009a) testaram a aplicação de CHX a 0.2% e a 2%, em adesivos *etch-and-rinse* (no estudo de Campos *et al.*, 2009a, também um adesivo *self-etch* foi considerado) durante 30 e 60 segundos, respectivamente. Nestes trabalhos, foram verificadas forças de união sistematicamente superiores nos grupos de teste face aos grupos de controlo (sem CHX), e semelhantes entre os grupos com maior e menor concentração de CHX, bem como entre os grupos com aplicação de CHX por 30 e por 60 segundos, após períodos de 6 meses (Breschi *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2009a) e 12 meses (Breschi *et al.*, 2009). Já no estudo de Loguercio *et al.* (2009) a avaliação do tempo de aplicação e concentração de CHX foi feita de forma mais alargada, tendo sido testadas para protocolos adesivos E&R concentrações de 0.002%, 0.02%, 0.2%, 2% e 4% por 60 segundos e 0.002% e 2% por 15 e 60 segundos, num período de 6 meses, e sido concluído que mesmo as concentrações e tempos de aplicação mais baixos não representaram uma diminuição das propriedades benéficas da CHX na adesão. A sobresaturação decorrente da aplicação de CHX a 4% acarretou, no entanto, resultados não tão positivos. Ainda, o uso de CHX a 0.002% (abaixo do limiar descrito como mínimo para a inibição da MMP-8), e sobretudo por apenas 15 segundos, sugeriu, apesar dos resultados positivos deste estudo *in vitro* a 6 meses, que se procure clarificar se a CHX nestas condições consegue, *in vivo* e a longo prazo, manter a capacidade inibitória desejável das MMPs e a preservação da camada híbrida da adesão.

Mais recentemente, um estudo de Kang *et al.* (2012) procurou igualmente avaliar um leque alargado de tempos de aplicação, neste caso para CHX a 2% aplicada após ataque ácido em adesivos *total etch*. Os diferentes tempos de aplicação da CHX, estudados *in vitro* e avaliados após termociclagem, foram de 5, 15, 30 e 60 segundos e resultaram na conclusão de que os diferentes tempos de aplicação produziam um efeito igualmente benéfico na resistência da adesão, e sempre superior à do controlo, inclusivamente para o tempo de aplicação mais baixo (5 segundos).

Um tempo de aplicação da CHX na ordem dos 15 segundos também foi testado nos trabalhos de Stanislawczuk *et al.*, mas aqui com a razão e particularidade de se encontrar incorporado num dos passos do protocolo adesivo de sistemas *total etch*, neste caso encontrando-se a CHX a 2% incorporada no ácido fosfórico. Em avaliações num período máximo de 6 meses (Stanislawczuk *et al.*, 2009) e 2 anos (Stanislawczuk *et al.*,

2011) e comparado a controlos sem CHX e com aplicação de uma solução de CHX a 2% por 60 segundos (escolhido este tempo de referência por à data do início dos estudos ainda não ter surgido evidência da eficácia de tempos de aplicação mais curtos), o ácido fosfórico contendo CHX revelou um comportamento tão positivo quanto a aplicação de CHX num passo separado, sendo que ambos apresentaram novamente resultados significativamente superiores de integridade da camada híbrida, quando comparados ao o grupo de controlo sem CHX. Uma eventual preocupação deste sistema de aplicação reside no decréscimo de substantividade da CHX quando em meios de pH mais baixos, contudo estes trabalhos demonstram que ainda assim o comportamento do gel ácido contendo CHX foi semelhante ao da CHX em solução aquosa, até porque não só uma certa desnaturação das MMPs se pode associar ao condicionamento ácido, como, mesmo a 0.1%, a CHX consegue funcionar em meios de pH mais baixo, sendo que, neste gel em particular, a concentração de CHX incorporada era razoavelmente superior a esse limiar (Stanislawczuk *et al.*, 2009). Estes dados sugerem que esta forma de aplicação é uma óptima opção para o clínico, no sentido de conseguir com os sistemas *total-etch* uma melhor estabilidade e durabilidade da adesão, sem que isto acarrete o acréscimo de um novo passo ao protocolo (Stanislawczuk *et al.*, 2009; Stanislawczuk *et al.*, 2011).

Outra indicação interessante neste contexto é a busca de formas de manter os protocolos adesivos na linha de estratégia de maior simplicidade, ao mesmo tempo que se procura incluir nestes o efeito benéfico da CHX. Outras estratégias neste sentido foram estudadas, incluindo a incorporação de CHX nas soluções adesivas. Contudo, e contrastando um pouco com a consistência que os resultados dos estudos da incorporação da CHX no gel ácido parecem indicar, os resultados destas outras abordagens não parecem ser tão uniformemente positivos (Stanislawczuk *et al.*, 2011).

Com efeito, o trabalho de De Munck *et al.* (2009) que incorporou CHX no *primer* até uma concentração de 0.05%, para um adesivo *total etch* e um *self-etch*, levou à conclusão de não se considerar tão positivo o efeito da CHX face ao controlo, sobretudo no adesivo *self-etch*. No trabalho, é sugerido que o carácter anfipático e o mecanismo quelante iónico da CHX (interferindo com a infiltração resinosa e ligação aos sais disponíveis), além da própria metodologia do estudo em termos de concentração da CHX e tipos de adesivo escolhidos (mais hidrofóbicos), poderão ter contribuído para esta conclusão. O trabalho de Zhou *et al.* (2009) vem um pouco de encontro a essa questão, concluindo por um efeito positivo da CHX incorporada ao

adesivo, em adesivos *self-etch* de dois passos, ao fim de 12 meses, conquanto a concentração de CHX presente fosse igual ou superior a 0.1%.

Um factor importante a ter em conta, respeitante à concentração ideal de CHX com vista ao seu efeito benéfico para a adesão à dentina, concerne na procura da resposta à questão de até que ponto a CHX se liga à dentina, e durante quanto tempo permanece presente como inibidor das MMPs, bem como a concentração óptima para saturar os locais de ligação, tanto em dentina mineralizada como desmineralizada, além da aferição dos elementos constituintes dos sistemas adesivos (como sendo solventes ou elementos resinosos) podem deslocar ou remover a CHX ligada à estrutura dentinária (Kim *et al.*, 2010). Tendo em mente que a CHX não previne completamente a degradação do colagénio (como aliás a grande maioria dos estudos abordados refere), mas consegue simplesmente retardá-la durante um determinado período de tempo, importará determinar a concentração de CHX necessária para que a sua permanência nos tecidos seja maximizada, uma vez que, se a quantidade de CHX ligada à dentina fosse alta o suficiente, seria possível uma melhor e mais efectiva inibição das MMPs por um período mais alargado de tempo (Kim *et al.*, 2011; Helvey, 2012).

Uma vez que a CHX parece poder ser parcialmente deslocada da dentina (apesar de apresentar uma muito maior ligação a dentina desmineralizada que mineralizada) por substâncias como o etanol ou a água, usados como solventes em alguns adesivos, as concentrações de CHX demasiado baixas poderão não ser suficientes para garantir o melhor efeito inibitório das MMPs ao longo do tempo, corroborando conclusões iniciais que concentrações demasiado baixas de CHX – rondando 0.05% – não apresentavam um potencial de inibição das MMPs satisfatório (Zhang *et al.*, 2009; de Munck *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Osorio *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011). Nesse sentido, o trabalho de Kim *et al.* (2011) permite concluir que, de entre concentrações de CHX de 0.02% a 2%, a adsorção da CHX à dentina é maior conforme a concentração é maior. Nesse trabalho, surge ainda um outro dado com potencial para ser mais um factor a ter em conta no papel da CHX enquanto elemento de benefício para a durabilidade da adesão: com o fornecimento de fontes minerais, a aplicação CHX em concentrações de 0.2% e 2%, por 60 segundos, pareceu ser efectiva enquanto contributo para o processo de remineralização, até certo ponto, da estrutura dentinária (efeito esse superior à da CHX a 0.02%). Os resultados desse estudo levantam a hipótese da CHX, enquanto agente com capacidade quelante e afinidade para iões minerais, poder agir como factor



adjuvante da remineralização da dentina subjacente à adesão. Este efeito seria particularmente relevante em adesivos *self-etch*, onde permanecem no meio elementos acídicos capazes de contribuir para o fornecimento contínuo de minerais e locais de renucleação (para formação de cristais), devido a um efeito condicionante menos forte que o dos sistemas *etch-and-rinse*. Ainda, se este efeito de remineralização se der durante o efeito inibitório das MMPs, poderá ser um outro factor contribuinte para o benefício da CHX na longevidade da adesão (Kim *et al.*, 2011).

#### 4.2 Tipo de adesivo

Para os adesivos *E&R*, parece surgir evidência científica de que o efeito benéfico da CHX para a durabilidade da adesão pode ser atingido de forma relativamente consistente, pelo menos para protocolos contemplando a aplicação de CHX a 2%, durante 30 a 60 segundos, após ataque ácido (Hebling *et al.*, 2005; Brackett *et al.*, 2007; Carrilho *et al.*, 2007b; Brackett *et al.*, 2009). As modificações, considerando menores concentrações e tempos de aplicação, ainda que com resultados promissores, carecem de uma maior base de confirmação por parte de mais estudos, sobretudo *in vivo*, uma vez que os estudos *in vitro* apresentam algumas limitações potencialmente relevantes. Exemplo disso é a ausência de um mecanismo fiável de emulação da pressão do fluido intrapulpar em direcção à camada híbrida que possa significar que maiores concentrações de CHX disponíveis no meio necessitem de estar disponíveis *in vivo*, por comparação aos meios *in vitro* para obter o mesmo efeito.

Já para os adesivos *self-etch* parece não haver ainda suficiente evidência para conclusões tão positivas igualmente fundamentadas (Moon *et al.*, 2010).

Com efeito, a introdução de um novo químico, como sendo a CHX, nos protocolos adesivos requer particular atenção e cuidado devido ao potencial desta adição poder perturbar o delicado equilíbrio químico dos adesivos e consequentemente afectar a capacidade adesiva de *primers* e/ou adesivos (Alex, 2012).

Um dos efeitos a ter em conta é a forma como as MMPs intrínsecas da dentina podem ser activadas pelas propriedades acídicas dos sistemas adesivos (Zhang *et al.*, 2009). O trabalho de Lehmann *et al.* (2009) deixou demonstrada a aumentada expressão de MMPs dentinárias após a aplicação de adesivos *self-etch*, quando a polpa se encontrava presente (podendo a semipermeabilidade das camadas híbridas deste tipo de

adesivos representar um factor facilitador deste fenómeno face a adesivos *total etch*), sugerindo assim que a aplicação de adesivos *self-etch* conseguem estimular a libertação de MMPs a partir do complexo pulpodentinário. Os adesivos *self-etch* parecem assim activar as MMPs latentes a níveis quase máximos, com *primers* acídicos com níveis de pH entre 1 e 2 a potenciarem uma actividade proteolítica até cerca de 14-15 vezes o normal, por oposição ao efeito menos notório de adesivos *total etch*, utilizando ácido fosfórico a 37% (com pH de cerca de 0.17), e assim provocar um efeito prejudicial à durabilidade da adesão resina-dentina desta forma, sobretudo se combinado este efeito com uma incompleta infiltração resinosa na matriz dentinária, mais patente para certos adesivos *self-etch* (Mazzoni *et al.*, 2006; Nishitani *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009).

Ainda assim, alguns dados apontam para a possibilidade de se poder explorar o efeito benéfico da CHX na durabilidade da adesão utilizando adesivos *self-etch*. Campos *et al.* (2009a) reporta um significativo efeito benéfico da CHX a 0.2% e 2%, tanto com sistemas *total etch* como *self-etch*, ainda que a concentração mais baixa (0.2%) não tenha conseguido esse efeito com o sistema *self-etch*.

Jang *et al.* (2010) e Chaharom *et al.* (2011) vêm afirmar que a aplicação de CHX a 2%, em adesivos *self-etch* de dois passos e *all-in-one*, não afecta a força de adesão imediata. Esta constatação não é inteiramente concordante com os resultados de Campos *et al.* (2009b), que sugeriam que CHX a 2% poderia apresentar um efeito prejudicial para sistemas *self-etch*, e apontavam assim para que fosse evitada a aplicação de CHX em concentrações superiores a 0.12%.

Avaliando o benefício da CHX na adesão sem acrescentar um passo extra aos protocolos preexistentes, estudos de Zhou *et al.* (2009); (2010) com CHX incorporada no *primer* de adesivos *self-etch* de dois passos, a várias concentrações (0.05%, 0.1%, 0.5% e 1%), permitem concluir que a CHX aplicada desta forma conseguirá preservar a qualidade da adesão dentária, desde que a concentração seja de 0.1% ou superior. Sugere-se inclusivamente ter este sistema vantagens próprias, conseguindo a CHX um efeito inibitório prolongado a partir da matriz resinosa adjunta à dentina.

Esta estratégia poderá, de qualquer das formas, acarretar algumas potenciais limitações no contexto das já mencionadas para os sistemas *self-etch*. Serão exemplos, o

possível efeito negativo da adição deste novo elemento nas forças de adesão conseguidas por estes adesivos ao longo do tempo, a perda gradual do efeito inibitório da CHX pela diminuição da sua presença na estrutura resinosa, ou a interacção do efeito inibitório da CHX com os iões de cálcio libertados. Surge assim a necessidade de mais estudos (sobretudo por períodos mais alargados de tempo e *in vivo*) que confirmem a não interacção negativa da CHX com os componentes destes adesivos, e a capacidade desta diminuir efectivamente ao longo do tempo a perda da força de adesão. Contudo, resultados como estes vão indiciando que o benefício da aplicação de CHX para a integridade da camada híbrida poderá ser extensível à sua aplicação com adesivos *self-etch*, inclusivamente sem a desvantagem do acréscimo de um novo passo no protocolo (Zhou *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Alex, 2012).

## 5. Conclusões

A revisão bibliográfica realizada nesta dissertação evidencia a grande complexidade dos vários sistemas adesivos e das considerações necessárias para que se caminhe para a obtenção da ideal estabilidade das interfaces criadas por estes sistemas, entre resina e dentina, ao longo do tempo.

Neste contexto, a CHX tem recentemente contribuído, não só para comprovar indirectamente a presença das MMPs na camada híbrida da adesão e a sua influência na perda da integridade e da durabilidade da mesma, como também para desenvolver a introdução de modificações aos protocolos adesivos visando contrariar este fenómeno e conseguir uma adesão clinicamente mais durável.

Actualmente, encontra-se suficiente evidência científica, atestada por pelo menos 14 meses *in vivo* e 2 anos *in vitro*, para permitir recomendar a aplicação de uma solução de CHX a 2%, por 30-60 segundos, após condicionamento ácido da dentina em adesivos *total etch*, para a obtenção um benefício clínico assinalável na durabilidade da adesão.

As particularidades dos sistemas adesivos, tanto *total etch* como *self-etch*, requerem a elaboração de mais estudos, sobretudo *in vivo* com períodos de avaliação mais alargados, que clarifiquem os mecanismos de acção tanto das MMPs como da CHX enquanto agente inibidor destas enzimas.

Apesar da necessidade de mais estudos e desenvolvimento desta área de conhecimento, este avanço na compreensão do papel de inibidores enzimáticos, como sendo a CHX, permite considerá-la um recurso com grande potencial clínico para a obtenção de restaurações mais estáveis e duráveis.

## 6. Referências bibliográficas

1. Alex G (2012). Is total-etch dead? Evidence suggests otherwise. *Compend Contin Educ Dent*. Jan; 33(1):12-4, 16-22, 24-5; quiz 26, 38.
2. Attin T, Abouassi T, Becker K, Wiegand A, Roos M, Attin R (2008). A new method for chlorhexidine (CHX) determination: CHX release after application of differently concentrated CHX-containing preparations on artificial fissures. *Clin Oral Investig*. Sep; 12(3):189-96.
3. Bengtson CRG, Bengtson AL, Bengtson NG, Turbino ML (2008). Efeito da clorexidina 2% na resistência de união de dois sistemas adesivos à dentina humana. *Pesq Bras Odontoped Clín Integr*. 8(1):51-6.
4. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, *et al.* (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:197-250.
5. Borges MF, Diesel PG, Corrêa FG, Bernardi E, Montagner AF, Skupien JA, Susin AH (2010). Reflections about Adhesive Systems. *Int J Odontostomat*. 4(1):47-52.
6. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Yamauchi M (2011). Distribution and relative activity of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Int J Oral Sci*. Oct; 3(4):192-9.
7. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH (2007). The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent*. Mar-Apr; 32(2):107-11.
8. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, Pashley DH (2009). In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent*. Jul-Aug; 34(4):379-83.

9. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, Cadenaro M, Foulger S, Mazzoti G, Tay FR, Di Lenarda R, Pashley D (2009). Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent.* Jun; 11(3):191-8.
10. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, Ruggeri A Jr, Tay FR, Dorigo Ede S, Pashley DH (2010). Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater.* Apr; 26(4):320-5.
11. Buonocore MG (1955). A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res.* Dec; 34(6):849-53.
12. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC (2009a). Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent.* Feb; 37(2):108-14.
13. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Pizzatto E, Morais EC (2009b). Influence of chlorhexidine concentration on microtensile bond strength of contemporary adhesive systems. *Braz Oral Res.* Jul-Sep; 23(3):340-5.
14. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L (2007a). Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* Jan; 86(1):90-4.
15. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D (2007b). In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* Jun; 86(6):529-33.
16. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, Breschi L, Foulger S, Pashley DH (2009). Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* Jul; 90(1):373-80.
17. Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, Tjäderhane L, Tay FR, Agee K, Pashley DH (2010). Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater.* Aug; 26(8):779-85.

18. Chaharom ME, Ajami AA, Kimyai S, Abbasi A (2011). Effect of chlorhexidine on the shear bond strength of self-etch adhesives to dentin. *Afr. J. Biotechnol.* 10(49): 10054-10057.
19. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S (2006). The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* Jan; 85(1):22-32.
20. Coelho A, Canta JP, Martins JNR, Oliveira SA, Marques P (2012). Perspetiva histórica e conceitos atuais dos sistemas adesivos amelodentinários – revisão da literatura. *Rev Port Estomatol Med Dent Cirmaxilofac.* 53(1):39–46.
21. Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. (1954). 1:6-di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (“hibitane”). Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *British J Pharmacol.* 9: 192-96.
22. De Freitas B M, Diesel G, P, Corrêa GF, Bernardi E, Fernandes MA, Skupien JA, Susin AH (2010). Reflections about adhesive systems. *Int. J. Odontostomat.* 4(1):47-52.
23. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B (2005). A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res.* Feb; 84(2):118-32.
24. De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B (2009). Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res.* Dec; 88(12):1101-6.
25. De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B (2010). Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci.* Oct; 118(5):494-501.
26. De Souza CA, Colombo AP, Souto RM, Silva-Boghossian CM, Granjeiro JM, Alves GG, Rossi AM, Rocha-Leão MH (2011). Adsorption of chlorhexidine on synthetic hydroxyapatite and in vitro biological activity. *Colloids Surf B Biointerfaces.* Oct 15; 87(2):310-8.
27. Eick JD, Gwinnett AJ, Pashley DH, Robinson SJ (1997). Current concepts on adhesion to dentin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 8(3):306-35.

28. Ercan E, Erdemir A, Zorba YO, *et al* (2009). Effect of different cavity disinfectants on shear bond strength of composite resin to dentin. *J Adhes Dent*; 11(5): 343-6.
29. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pécora JD, Sousa-Neto MD (2003). Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J*; 14(1):58-62.
30. Foulkes DM (1973). Some toxicological observations on chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl*.12:55-60.
31. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D (1999). Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol*. May; 6(3): 437-9.
32. Gürkan S, Bolay S, Kiremitçi A (1999). Effect of disinfectant application methods on the bond strength of composite to dentin. *J Oral Rehabil*. Oct; 26(10):836-40.
33. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H (2000). In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res*. Jun; 79(6): 1385-91.
34. Hashimoto M, Tay FR, Ito S, Sano H, Kaga M, Pashley DH (2005). Permeability of adhesive resin films. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. Aug; 74(2):699-705.
35. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR (2005). Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. *J Dent Res*, 84 (8): 741–746.
36. Helvey GA (2012).The durability of the resin/dentin complex. *Compend Contin Educ Dent*. Mar; 33(3):212-3.
37. Jang SH, Hur B, Kim HC, Kwon YH, Park JK (2010). Effect of 2% chlorhexidine application on microtensile bond strength of resin composite to dentin using one-step self-etch adhesives. *JKACD* 35(6):486-490.
38. Kang HJ, Moon HJ, Shin DH (2012). Effect of different chlorhexidine application times on microtensile bond strength to dentin in Class I cavities. *Restor Dent Endod*. Mar; 37(1):9-15.
39. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, Carvalho RM, Tjäderhane L, Looney S, Wimmer C, Tezvergil-Mutluay A,

Tay FR, Pashley DH (2010). Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater.* Aug; 26(8):771-8.

40. Kim DS, Kim J, Choi KK, Kim SY. (2011). The influence of chlorhexidine on the remineralization of demineralized dentine. *Journal of Dentistry.* Dec; 39(12):855-62.

41. Komori PC, Pashley DH, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, de Goes MF, Wang L, Carrilho MR (2009). Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Oper Dent.* Mar-Apr; 34(2):157-65.

42. Kugel G, Ferrari M (2000). The science of bonding: from first to sixth generation. *J Am Dent Assoc.* 131:20S–5S.

43. Lehmann N, Debret R, Roméas A, Magloire H, Degrange M, Bleicher F, Sommer P, Seux D (2009). Self-etching increases matrix metalloproteinase expression in the dentin-pulp complex. *J Dent Res.* Jan; 88(1):77-82.

44. Leitune VC, Portella FF, Bohn PV, Collares FM, Samuel SM (2011). Influence of chlorhexidine application on longitudinal adhesive bond strength in deciduous teeth. *Braz Oral Res.* Sep-Oct; 25(5): 388-92.

45. Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA (2010). Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci.* Jan-Feb; 18(1):50-8.

46. Llana-Puy C, Forner-Navarro L (2008). Evidence concerning the medical management of caries. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* May 1;13(5):E325-30.

47. Lindhe J, Lang NP, Karring T (2003). Clinical periodontology and implant dentistry. Blackwell Munksgaard 4<sup>th</sup> ed.

48. Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A (2009). Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci.* Oct; 117(5):587-96.

49. Marsh PD (1992). Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res.* Jul; 71(7):1431-8.



50. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M (1997). The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* Nov; 25(6):441-58.
51. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR (2006). Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials.* Sep; 27(25):4470-6.
52. McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P (2003). Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* Aug; 69(8):4770-6.
53. Meiers JC, Shook LW (1996). Effect of disinfectants on the bond strength of composite to dentin. *Am J Dent.* Feb; 9(1):11-4.
54. Milstone AM, Passaretti CL, Perl TM (2008). Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. *Clin Infect Dis.* Jan 15; 46(2):274-81.
55. Moon PC, Weaver J, Brooks CN (2010). Review of matrix metalloproteinases' effect on the hybrid dentin bond layer stability and chlorhexidine clinical use to prevent bond failure. *Open Dent J.* Jul 20;4:147-52.
56. Nagase H, Woessner JF Jr (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* Jul 30. 274(31):21491-4.
57. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E (1982). The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 16:265-273.
58. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH (2006). Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci.* Apr; 114(2):160-6.
59. Omata Y, Uno S, Nakaoki Y, Tanaka T, Sano H, Yoshida S, Sidhu SK (2006). Staining of hybrid composites with coffee, oolong tea, or red wine. *Dent Mater J.* Mar; 25(1):125-31.
60. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley D, Tay F, Toledano M (2011). Effect of dentin etching and chlorhexidine

application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci.* Feb; 119(1):79-85.

61. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S (2004). Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* Mar;83(3):216-21.

62. Perdigão J, Denehy GE, Swift EJ (1994). Effects of chlorhexidine on dentin surfaces and shear bond strengths. *Am J Dent.* 7: 81-84.

63. Perdigão J (2007). New developments in dental adhesion. *Dent Clin N Am.* 51:333-357.

64. Perdigão J (2010). Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater.* Feb; 26(2):e24-37.

65. Pilo R, Cardash HS, Oz-Ari B, Ben-Amar A (2001). Effect of preliminary treatment of the dentin surface on the shear bond strength of resin composite to dentin. *Oper Dent.* Nov-Dec; 26(6):569-75.

66. Pomacóndor-Hernández C (2010). Role of chlorhexidine in restorative dentistry. *Odontol Sanmarquina.* 13(2): 46-49.

67. Puig Silla M, Montiel Company JM, Almerich Silla JM (2008). Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* Apr 1;13(4):E257-60.

68. Say EC, Koray F, Tarim B, Soyman M, Gülmez T (2004). In vitro effect of cavity disinfectants on the bond strength of dentin bonding systems. *Quintessence Int.* Jan; 35(1):56-60.

69. Scherrer SS, Cesar PF, Swain MV (2010). Direct comparison of the bond strength results of the different test methods: a critical literature review. *Dent Mater.* Feb; 26(2):e78-93.

70. Siqueira JF Jr, Paiva SS, Rôças IN (2007). Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod.* May; 33(5):541-7.

71. Slot DE, Vaandrager NC, Van Loveren C, Van Palenstein Helderman WH, Van der Weijden GA (2011). The effect of chlorhexidine varnish on root caries: a systematic review. *Caries Res*;45(2):162-73.

72. Soares CJ, Pereira CA, Pereira JC, Santana FR, do Prado CJ (2008). Effect of chlorhexidine application on microtensile bond strength to dentin. *Oper Dent*. Mar-Apr; 33(2):183-8.
73. Souza LB, de Aquino SG, de Souza PP, Hebling J, Costa CA (2007). Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine. *Am J Dent*. Dec; 20(6):400-4.
74. Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler D, Reis A, Loguercio AD (2009). Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds. *Oper Dent*. Jul-Aug; 34(4):481-90.
75. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD (2011). A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent*. Jan; 39(1):40-7.
76. Summit JB, Robbins JW, Schwarts RS (2001). Fundamentals of Operative Dentistry. A Contemporary Approach. *Quintessence Publishing Co, Inc*. Chicago. 2<sup>nd</sup> ed.
77. Swift EJ, Perdigão J, Heymann HO (1995). Bonding to enamel and dentin: A brief history and state of the art. *Quintessence Int*. 26: 95-110.
78. Tay FR, Pashley DH (2003). Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc*. Dec; 69(11):726-31.
79. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Carrilho M, Breschi L, Tjäderhane L, Nishitani Y, Carvalho RM, Looney S, Tay FR, Pashley DH (2010). The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *Dent Mater*. Nov; 26(11):1059-67.
80. Vaidyanathan M, Sheehy EC, Gilbert SC, Beighton D (2009). Antimicrobial properties of dentine bonding agents determined using in vitro and ex vivo methods. *J Dent*. Jul;37(7):514-21.
81. Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P *et al.* (2001). Adhesives and cements to promote preservation dentistry. *Oper Dent* (Suppl 6):119-144.
82. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P *et al.* (2003). Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentine: current status and future challenges. *Oper Dent*. 28:215-235.

83. Van Noort R, Cardew GE, Howard IC, Noroozi S (1991). The effect of local interfacial geometry on the measurement of the tensile bond strength to dentin. *J Dent Res*. May; 70(5):889-93.
84. Van Noort R. Clinical relevance of laboratory studies on dental materials: strength determination - a personal view (1994). *J Dent*; 22 Suppl 1:S4-8.
85. Varun BR, Nair BJ, Sivakumar TT, Joseph AP (2012). Matrix metalloproteinases and their role in oral diseases: a review. *Oral & Maxillofacial Pathology Journal*; Jan-Jun, 1(3):186-191.
86. Visse R, Nagase H (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 92:827-839.
87. Zhang SC, Kern M (2009). The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci*. Dec; 1(4):163-76.
88. Zhou J, Tan J, Chen L, Li D, Tan Y (2009). The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro. *J Dent*. Oct; 37(10):807-12.
89. Zhou J, Tan J, Yang X, Cheng C, Wang X, Chen L (2010). Effect of chlorhexidine application in a self-etching adhesive on the immediate resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent*. Feb; 12(1):27-31.